

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592471

研究課題名（和文）卵巣明細胞腺癌幹細胞マーカーの同定および標的分子としての臨床応用

研究課題名（英文）Identification of potential marker of cancer stem cell from ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

鈴木 吉也（SUZUKI, KICHIYA）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：30422116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円、（間接経費） 1,170,000 円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌がしばしば示す治療抵抗性獲得機構には癌幹細胞が関与していることから本研究では卵巣癌幹細胞に特異的なマーカーの同定を目指した。卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する癌幹細胞マーカーを同定するために、卵巣明細胞腺癌株（2種）を用いて、いくつかの卵巣がん幹細胞マーカー候補分子を目印にして分画しNOGマウスに接種を行った。EpCAM(+)と(-)で分画した場合、(-)分画の方が高い腫瘍増殖傾向を示した。しかしEpCAM発現抑制された細胞株は増殖抑制される事が明らかとなった。これらin vivoとin vitroでそれぞれ相反する結果となったがその作用機序については不明である。

研究成果の概要（英文）：Ovarian cancer frequently demonstrates chemotherapy-resistant mechanism and it has been recently reported that cancer stem cell is involved in this mechanism. We have planned to determine potential marker for cancer stem cell of ovarian cancer. We have chosen two ovarian cancer cell lines out of nine ovarian cancer cell lines based on tumor growth activity using immune deficient mice experiment (NOG mice). We have searched several potential marker for cancer stem cell and found that EpCAM negative population demonstrates high growth rate when inoculated to NOG mice. We have established EpCAM knock-down cell lines under doxycycline control. Unexpectedly the cell lines demonstrate growth inhibition when EpCAM expression was decreased. These data obtained from in vivo and in vitro experiments show some discrepancy however the mechanism is still unclear.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌 がん幹細胞 表面マーカー 免疫不全マウス フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

男性と異なり、40歳代の女性では乳癌、子宮癌、卵巣癌などの婦人科系疾患による死亡が多くを占める。実際、卵巣癌罹患者は毎年8000人前後、死亡者は4000人以上である(国立がん研究センター2008年調査)。近年、手術法標準化と Paclitaxel と白金製剤による化学療法の進歩により治療成績に著しい向上は見られるものの、進行症例の5年生存率は未だに30%前後と予後不良である(卵巣がん治療ガイドラインより)。卵巣癌の多くは治療初期に化学療法に非常に良く反応し、臨床的寛解に至ることも少なくない。しかし完治することは稀であり多くは再発して抗癌剤治療が再び必要となる。これを繰り返すうちに徐々に薬剤耐性を獲得しやがて治療抵抗性となってしまう、特に卵巣明細胞腺癌は治療抵抗性を示す事が多い。以上より卵巣癌治療の最大の障壁はこの薬剤耐性問題であると我々は考える。

この機構には癌幹細胞が強く関与していることがすでに示されている(Reya et al, Nature 2007, Visvader et al, Nature Rev Cancer 2008)。がん幹細胞の存在が報告されたのは白血病が初めて(Lapidot et al, Nature 1994, Bonnet et al, Nature Med 1997)、固形癌としては2003年に乳癌でCD24⁻, CD44⁺分画に癌幹細胞が存在する事が報告されたのが最初である(Al-Hajj et al, PNAS 2003)。他にも脳腫瘍ではCD133陽性細胞が (Singh et al, Cancer Res 2003, Singh et al, Nature 2004)、膵臓癌ではEpCAM⁺/CD44⁺/CD24⁺ (Li et al, Cancer Res 2007)やCD133⁺ (Hermann et al, Cell Stem Cell 2007)が癌幹細胞である事が報告されている。これらのうちEpCAM (別名CD326、上皮特異抗原 ESA、ヒト上皮抗原HEA) は連携研究者の菅村が肝癌幹細胞マーカーとして有用であると報告した(Kimura et al, Cancer Sci 2010)。一方卵巣癌における癌幹細胞の存在はSzotekらにより初めて示された(Szotek et al, PNAS 2006)。この癌幹細胞の実体はHoechst 33342の排出能が亢進したSP(side population)細胞集団であるが、ヌードマウスを使った実験でも腫瘍形成能が高い事を示している(Szotek et al, PNAS 2006)。その後も他の研究グループにより、卵巣癌幹細胞マーカー候補としてCD133(Kusumbe et al, Stem Cells 2009)、CD117 (c-kit)(Ma et al, Acta Biochim Biophys Sin 2010)、Aldehyde Dehydrogenase (Landen et al, Mol Cancer Ther 2010)などが報告されている。しかしながら、臓器ごとによりマーカーの発現パターンが異なり、さらには同じ組織でも、大腸癌や膵臓癌ではCD44⁺という報告とCD133⁺という報告があるように、これらの報告の違いが一体何によるのか、例えば実験手法、細胞株、使用動物の違いによるものなのか、など未だに明らかになっていない面も多い。同様に卵巣癌幹細胞マーカー研究においても上に述べた通りSP分画、CD133⁺、CD117、Aldehyde Dehydrogenaseが

癌幹細胞マーカーの候補として報告されているが、他にも絶対的な癌幹細胞マーカーとなりうる分子が存在する可能性はあると我々は考えた。

2. 研究の目的

卵巣癌がしばしば示す治療抵抗性獲得機構には癌幹細胞が関与している事が最近の研究で明らかとなってきた。本研究ではフローサイトメトリーFACS AriaIIによる細胞分画法と超免疫不全マウス(NOG マウス)による腫瘍 in vivo assay法を活用し卵巣癌幹細胞に特異的なマーカーの同定を目指す。卵巣癌の中でも特に予後不良な卵巣明細胞腺癌に注目し、同癌由来細胞株および新鮮臨床検体を用いた機能的スクリーニングを行い卵巣明細胞腺癌特異的なマーカー分子同定を目指した。さらに、当研究所が設立した全国的にもユニークな Tissue Bank を活用し、将来の分子標的治療薬の開発および臨床応用へと橋渡しすることを最終目的とした。

3. 研究の方法

我々がこれまでに卵巣癌細胞株を用いて行った予備実験のデータを元に、本研究では臨床新鮮卵巣癌組織を対象に卵巣癌細胞表面マーカーを臨床応用する事を最終目的に、3年以内を目標に以下の研究計画を立案した。研究計画1.卵巣癌細胞株における候補分子マーカー発現強度を指標にしたセルソーティングおよびNOGマウスを用いた in vivo 生着実験。研究計画2.臨床新鮮卵巣癌組織における候補分子マーカー発現強度を指標にしたセルソーティングおよびNOGマウスを用いた新鮮癌組織の in vivo 生着実験。研究計画3.候補癌幹細胞マーカーに対するノックダウン siRNA 導入による機能解析。

<方法概要>

研究計画1で我々は卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する癌幹細胞マーカーを同定するために、卵巣明細胞腺癌株(4種)およびコントロール用に他組織型卵巣癌株(5種)を用い、各種癌幹細胞マーカーの発現をFACS AriaIIを用いて発現解析、比較検討を行い、これらの中から癌幹細胞マーカー候補を選択する。その後幹細胞の性質の有無を、

Sphere colony assay NOGマウス接種により確認する。研究計画2では計画1で選択したマーカー候補の発現パターンを手術で得られる新鮮卵巣癌組織または当センター内の Tissue Bank に保存してある新鮮凍結卵巣癌組織(現在約80例、今後もさらに蓄積予定)を用いて組織型で分類し発現確認する。癌幹細胞は全細胞集団に対して少数細胞集団として存在するという特性を用いて、候補分子マーカーの population を指標に、コラゲナーゼ処理した臨床卵巣癌組織をマーカー高発現分画、低発現分画に分離し、それぞれの細胞分画を連携研究者の菅村が開発に携わった超免疫不全 NOG マウスに移植する。

NOG マウスは T、B、NK 細胞を欠損する免疫不全マウスで、異種間細胞移植が容易に行えるという特性を有する。さらに当がんセンターには全国有数の NOG マウスセンターが設置されており NOG マウスが実験動物中央研究所より毎月 60 匹と潤沢に供給される体制が整っている。この NOG マウスを用いて移植腫瘍細胞数、タイムコースなどのパラメーターを設定し、腫瘍形成能、増殖能を解析する。これらの結果をふまえて最終的にどの分子マーカーのどの分画に幹細胞が多く含まれているかを決定した。

研究計画 3. 前年度に最終的な候補標的分子を決定した後、標的分子に対する small interference (si)RNA 配列、GFP、薬剤選択マーカーを組み込んだレンチウイルスベクターを作製し、卵巣明細胞腺癌細胞株に感染させ、*in vitro* で解析する。もし siRNA 発現により卵巣明細胞腺癌細胞株の腫瘍形成能や増殖能に変化が生じれば、この分子が癌幹細胞マーカーである事の重要な証拠となる。その後、同様実験を新鮮卵巣癌手術検体又は Tissue bank 内の卵巣癌検体を用いて行い、将来的な標的分子となりうるか確認検討する。

4. 研究成果

卵巣癌患者由来の卵巣癌細胞株 9 種類に対しフローサイトメトリーを用いて癌幹細胞マーカーとなりうる表面分子群 SP 分画、

	ES2	TOV21G	TOV112D	OV90	JHOS3	JHOS4	JHOC7	JHOC8	CAOV3
組織型	明細胞	明細胞	類内膜	漿液性	漿液性	漿液性	明細胞	明細胞	漿液性
NOG 生着の有無	+	+	+	+	-	-	-	+	-
接種細胞数	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell	1x10 ⁷ cell
成長速度	速い	速い	速い	速い	-	-	-	速い	-

図 1. 卵巣癌細胞株 9 種を超免疫不全 NOG マウスに接種したところ、生着能、増殖能に違いが認められた。なかでも TOV112D と明細胞腺癌由来の ES2 と TOV21G が非常に強い腫瘍増殖能を示した (Suzuki et al, 未発表データ)。

CD133、CD90、CD44、EpCAM) の発現解析を行った。その結果、EpCAM の発現パターンが特徴的であり、これらを超免疫不全 (NOG) マウスへ移植した後の腫瘍形成能に逆の相関があることが示された (図 1 および 2)。

この結果はこれまで膵癌や肝臓癌では EpCAM 陽性細胞に癌幹細胞が存在するとする報告と逆の結果となった。ここで、TGFbeta という分子はある条件下では造腫瘍効果を示すが別の条件下では腫瘍抑制効果を示すなど興味深い振る舞いをする (Bierie and Moses, Nature Rev Cancer 2006)。我々は EpCAM もそのような挙動を示す分子である可能性を仮定している。よって第一に EpCAM を指標に ES2、TOV21G などの卵巣

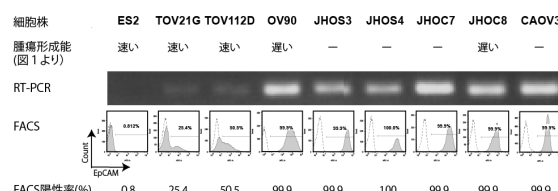


図 2. 卵巣癌細胞株表面マーカーの FACS および RT-PCR による解析。腫瘍形成能に関する遺伝子を RT-PCR, FACS を指標にクリーニングを行う。例として EpCAM を示すが、卵巣癌の場合この分子の発現パターンは腫瘍形成能と負の相関を示す可能性がある。(Suzuki et al, 未発表データ)。

明細胞腺癌由来細胞株に注目し、腫瘍形成能など詳細を解析中である。また、我々は同じメソッドで既知の幹細胞マーカーを指標とし卵巣癌細胞集団を分画し詳細な解析を行う事で将来の癌幹細胞マーカー探索の道が開けると考えた。

なかでも EpCAM(+) と EpCAM(-) で分画し NOG マウスに接種した結果、EpCAM(-) 分画の方が高い腫瘍増殖傾向を示した (図 3 および 4)。

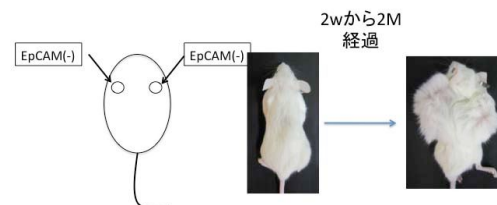


図 3. NOG マウスへの分画後卵巣癌株接種方法

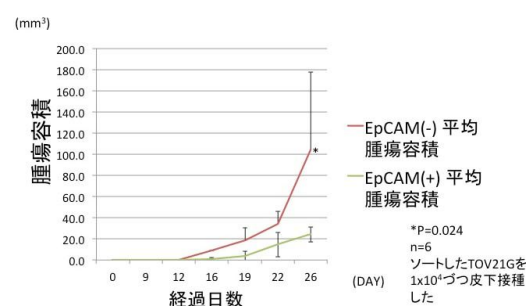


図 4. EpCAM を指標に分取した細胞株 (TOV21G 明細胞癌株) の NOG マウスへ接種後の腫瘍容積変化

さら EpCAM ノックダウン siRNA 導入により腫瘍増殖能がどのように変化するか解析を行った。まず卵巣がん細胞株にドキシサイクリン誘導型の EpCAM 遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入し EpCAM 遺伝子がドキシサイクリン投与により発現抑制される事を確認した。この遺伝子導入細胞株を用いて成長曲線を調べた所、ドキシサイクリンで EpCAM 発現抑制された細胞株が増殖抑制される事が明らかとなった (図 5)。これら *in vivo* と *in vitro* でそれぞれ相反する結果となったがその作用機序については不明であ

る。

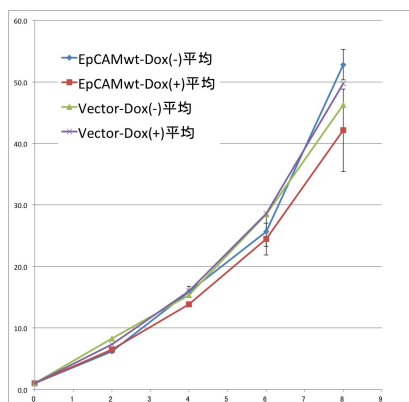


図5. EpCAM ノックダウン細胞株 (赤線) は増殖抑制を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件 全て査読あり)

1. Suzuki F, Nagase S, Suzuki K, Oba E, Hiroki E, Matsuda Y, Akahira J, Nishigori H, Sugiyama T, Otsuki T, Yoshinaga K, Takano T, Niikura H, Ito K, Sasano H, and Yaegashi N. Decreased Expression of 14-3-3σ is Predictive of Poor Prognosis for Patients with Human Uterine Papillary Serous Carcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 231:193-9. 2013 doi:10.1620/tjem.231.193
2. Shiozaki K, Takeshita K, Ikeda M, Ikeda A, Harasaki Y, Komatsu M, Yamada S, Yamaguchi K, Miyagi T. Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, neu3a and neu3b, from medaka (*Oryzias latipes*). *Biochimie* 95: 280-289. 2013 doi:10.1016/j.biochi.2012.09.026.
3. Bhardwaj A, Song HW, Beildeck M, Kerkhofs S, Castoro R, Shanker S, De Gendt K, Suzuki K, Claessens F, Issa JP, Orgebin-Crist MC, Wilkinson MF. DNA demethylation-dependent AR recruitment and GATA factors drive Rhox5 homeobox gene transcription in the epididymis. *Mol Endocrinol*. 26:538-49. 2012 doi:10.1210/me.2011-1059.
4. Kawamura S, Sato I, Wada T, Yamaguchi K, Li Y, Li D, Zhao X, Ueno S, Aoki H, Tochigi T, Kuwahara M, Kitamura T, Takahashi K, Moriya S, Miyagi T. Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. *Cell*

Death Differ. 19:170-9. 2012 doi:10.1038/cdd.2011.83.

2012

5. Suzuki T, Yamaguchi K. Structure, Biosynthesis and Function Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease, 2012, 188-208 Joe Tiralongo and Ivan Martinez-Duncker (Eds) Bentham Science Publishers CHAPTER 6 Mammalian Sialidases. 2012 doi: 10.2174/97816080538651130101

6. Takahashi K, Mitoma J, Hosono M, Shiozaki K, Sato C, Yamaguchi K, Kitajima K, Higashi H, Nitta K, Shima H, Miyagi T. Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 287: 14816-14826. 2012 doi:10.1074/jbc.M111.324186.

7. Miyagi T, Yamaguchi K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* 22: 880-896. 2012 doi:10.1093/glycob/cws057.

8. Yamaguchi K, Shiozaki K, Moriya S, Koseki K, Wada T, Tateno H, Sato I, Asano M, Iwakura Y, Miyagi T. Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. *PLoS One* 7: e41132. 2012

9. Miyagi T, Takahashi K, Moriya S, Hata K, Yamamoto K, Wada T, Yamaguchi K, Shiozaki K. Altered expression of sialidases in human cancer. *Adv Exp Med Biol*. 749: 257-267. 2012 doi: 10.1007/978-1-4614-3381-1_17.

10. Koseki K, Wada T, Hosono M, Hata K, Yamaguchi K, Nitta K, Miyagi T. Human cytosolic sialidase NEU2-low general tissue expression but involvement in PC-3 prostate cancer cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 428: 142-149. 2012 doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.028.

11. Shiozaki K, Yamaguchi K, Takahashi K, Moriya S, Miyagi T. Regulation of sialyl lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *J Biol Chem*. 286: 21052-21061. 2011 doi:10.1074/jbc.M111.231191.

12. 山口 豊範, 宮城 妙子 シアリダーゼ、生物機能モデルと新しいリソースリサーチツール, pp340-345, エルアイシー, 2011 <http://homepage3.nifty.com/lic/books/nbs09.html>

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 吉也 (SUZUKI, KICHIYA)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号: 30422116

(2)研究分担者

山口 壹範 (YAMAGUCHI, KAZUNORI)

宮城県立がんセンター・発がん制御研究部・主任研究員

研究者番号: 80373215